

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE

UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÂNDREA CRISTINA RAMOS

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM

CÉREBRO DE RATOS INFANTES APÓS A ADMINISTRAÇÃO

AGUDA DE L-TIROSINA

CRICIÚMA, 2012

ÂNDREA CRISTINA RAMOS

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM
CÉREBRO DE RATOS INFANTES APÓS A ADMINISTRAÇÃO
AGUDA DE L-TIROSINA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade do
Extremo Sul Catarinense para
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz
Streck.

CRICIÚMA, 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R175a Ramos, Ândrea Cristina.

Avaliação do metabolismo energético em cérebro de ratos
infantes após a administração aguda de L-Tirosina / Ândrea
Cristina Ramos ; orientador: Emílio Luiz Streck. – Criciúma :
Ed. do Autor, 2012.

31 f. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Criciúma, 2012.

1. Erros inatos do metabolismo. 2. Tirosinemia. 3. Doença
autossômica recessiva. 4. Metabolismo energético.
5. Medicamentos – Administração. I. Título.

CDD. 22. ed. 616.042

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado apresentado pela candidata **Ândrea Cristina Ramos** sob o título “**Avaliação do metabolismo energético em cérebro de ratos infantis após a administração aguda de l-tirosina**” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido à candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito B.

Criciúma, SC, 29 de novembro de 2012

Alexandra Zugno

Profa. Dra. Alexandra Toppi Zugno

Membro Relator

Josiane Budni

Profa. Dra. Josiane Budni

Membro Interno

Carolina Maso Viegas

Profa. Dra. Carolina Maso Viegas

Membro Externo

Emílio Luiz Streck

Prof. Dr. Emílio Luiz Streck

Orientador

Emílio Luiz Streck

Prof. Dr. Emílio Luiz Streck

Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioenergética do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

**Dedico este trabalho a minha
família, e especialmente ao meu
noivo Cássio Nunes.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda a conquista até este momento, que sempre me deu força nos momentos mais difíceis, e que me deu muitas alegrias e realizações nesse caminho.

Ao meu noivo Cássio Abreu dos Santos Nunes, que participou intensamente nessa minha trajetória, e que muito me ajudou, oferecendo-me carinho, amizade, companheirismo e acima de tudo amor.

As pessoas que sempre me ajudaram e que sempre me deram força coragem e amor, meus pais Sônia e Jailson e meus irmãos Juliano e Irian.

Ao meu orientador Emilio Streck que muito me ajudou no desenvolvimento deste trabalho.

A todas as minhas amigas, Gabriela, Thaís, Cinara, Gislaine, Giselli que todos os momentos sempre me ajudaram me deram amizade, conselhos, sorrisos. E a toda a equipe do laboratório de Bioenergética.

A todos os professores do Mestrado em Ciências da Saúde que contribuíram e muito para conquista do meu caminho e me tornar um profissional exemplar.

Ao longo dessa trajetória muito aprendi, sob vários aspectos pessoais e profissionais, e cada um de vocês aqui mencionados fizeram parte desta minha conquista. Só tenho a agradecer e dizer que por mim sempre serão lembrados com muito carinho.

Muito Obrigada a Todos!!!

**“Ninguém ignora tudo. Ninguém
sabe tudo. Todos nós sabemos
alguma coisa. Todos nós
ignoramos alguma coisa. Por isso
aprendemos sempre. “**
Paulo Freire

RESUMO

Mutações no gene tirosina aminotransferase (TAT) causam tirosinemia tipo II (síndrome de Richner-Hanhart) é uma doença autossômica recessiva causada pela atividade reduzida ou inexistente da enzima tirosina aminotransferase, o que leva a um aumento dos níveis sanguíneos de tirosina e manifestações clínicas como ceratite, lesões palmo plantares dolorosas e hiperqueratose e inflamações nos olhos. As manifestações neurológicas são variáveis e alguns pacientes tem desenvolvimento normal, enquanto outros mostram diferentes graus de retardo no desenvolvimento. Considerando que aumento dos níveis de tirosina no sangue, causam manifestações neurológicas e que os mecanismos responsáveis por estas alterações são mal compreendidos. No presente estudo, foram avaliados os efeitos da administração de L-tirosina sobre a atividade das enzimas citrato sintase, malato desidrogenase, succinato desidrogenase, e complexos I, II, II-III, e IV da cadeia respiratória mitocondrial no córtex, hipocampo e estriado de ratos com 10 dias de idade. Ratos Wistar foram mortos uma hora após uma única injeção intraperitoneal de tirosina (500mg/kg) ou solução salina. As atividades das enzimas do metabolismo energético foram avaliadas. Os nossos resultados demonstram que a administração aguda de L-tirosina em ratos com 10 dias de idade, inibiu a enzima citrato sintase e a atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial no estriado. A enzima succinato desidrogenase e atividade do complexo II-III foram aumentadas no hipocampo. Além disso, a malato-desidrogenase e a atividade do complexo IV não foram alteradas pela administração aguda de L-tirosina. Em particular, diversos grupos relataram que a tirosina administrada sistemicamente é diferencialmente distribuída entre as regiões do cérebro. Em conclusão, os nossos resultados indicam que uma alteração no metabolismo energético do hipocampo e corpo estriado pode levar a danos no desenvolvimento na aquisição, recuperação, consolidação e no armazenamento de memória, e os processos cognitivos após a administração aguda de L-tirosina em ratos infantis. Assim, nossos resultados contribuem para um melhor conhecimento da fisiopatologia da hipertirosinemia.

Palavras-chave: Tirosina, tirosinemia tipo II, metabolismo energético, ratos infantis.

ABSTRACT

Mutations in the TAT gene cause tyrosinaemia type II (Richner–Hanhart syndrome). It is an autosomal recessive disorder caused by, producing a TAT enzyme with decreased or inexistent activity, which leads to increased blood tyrosine levels and clinical manifestations such as keratitis and/or painful palmoplantar hyperkeratotic lesions and inflammations in the eyes. Neurological manifestations are variable and some patients are developmentally normal, while others show different degrees of developmental retardation. Considering that increased blood tyrosine levels cause neurological manifestations and that the mechanisms responsible by this alterations are poorly understood, In the present study, we evaluated the effects of L-tyrosine administration on the activities of enzymes citrate synthase, malate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, and complexes I, II, II-III, and IV of mitochondrial respiratory chain in the posterior cortex, hippocampus and striatum of rats with 10-day-old. Wistar rats were killed one hour after a single intraperitoneal injection of either tyrosine (500 mg/kg) or saline. The activities of energy metabolism enzymes were evaluated. Our results demonstrated that the acute administration of L-tyrosine in rats with 10-day-old inhibited the citrate synthase enzyme and the complex I and II activity of the mitochondrial respiratory chain in the striatum. The succinate dehydrogenase enzyme and the complex II-III activity were increased in the hippocampus. Furthermore, the malate dehydrogenase and the complex IV activity were not altered by an acute administration of L-tyrosine. In particular, several groups report that systemically administered tyrosine is differentially distributed across brain regions. In conclusion, our results indicate that an alteration in the energetic metabolism of the hippocampus and striatum can leads to damage in the involved in acquisition, retrieval, consolidation and storage of memory, and cognitive processes after the acute administration of L-tyrosine in young rats. Thus our results contribute to a better knowledge of the pathophysiology of hypertyrosinemia.

Keywords: Tyrosine, tyrosinemia type II, energy metabolism, young rats.

LISTA DE ABREVIATURAS

4HPP- Ácido 4-hidroxifenilpirúvico

4-HPPD- 4-hidrofenilpirúvico dioxigenase

ADP- Difosfato de Adenosina

ATP- Adenosina Trifosfato

AVC- Acidente Vascular Cerebral

DA - Dopamina

DNA - Ácido Nucleico Desoxirribose

EIM- Erros Inatos do Metabolismo

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FAA- Ácido fumarilcetoacético

FADH₂- Flavina Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)

FAH- Fumarilacetoacetato Hidrolase

GTP- Guanosina Trifosfato

HGA- Ácido Homogentísico

LCR- Líquido cefalorraquidiano

MAA- Ácido maleilacetoacético

NADH- Nicotinamida Adinina Dinucleotídeo (forma reduzida)

SNC- Sistema Nervoso Central

TAT- Tirosina Aminotransferase

TH – Tirosina Hidroxilase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Catabolismo da tirosina. As enzimas 7 e 8 ainda não foram identificadas. Adaptado de Mitchell et al., 2001. Página 14

Figura 2 Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre a atividade da enzima citrato sintase em cérebro de ratos infantis. Página 29

Figura 3 Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre a atividade enzimática da malato desidrogenase em cérebro de ratos infantis. Página 30

Figura 4 Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase em cérebro de ratos infantis. Página 30

Figura 5 Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis. Página 31

Figura 6 Efeito da administração aguda de L-tirosina na atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis. Página 32

Figura 7 Efeito da administração aguda de L-tirosina na atividade II-III complexo da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis. Página 32

Figura 8 Efeito da administração aguda de L-tirosina na atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis. Página 33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Erros Inatos do metabolismo.....	14
1.2 Tirosina.....	14
1.3 Tirosinemia.....	15
1.3.1 Tirosinemia Tipo II.....	16
1.3.1.1 Histórico.....	16
1.3.1.2 Manifestações Clínicas.....	17
1.3.1.3 Diagnóstico.....	18
2.0 METABOLISMO ENERGÉTICO.....	19
2.1 Cadeia Respiratória Mitocondrial.....	21
3.0 OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Desenho Experimental.....	24
4.2 Dosagens Bioquímicas.....	25
4.3 Análise Estatística.....	26
5 RESULTADOS.....	27
6 DISCUSSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

O termo "erros inatos de metabolismo" (EIM) foi introduzido por Sir Archibald E. Garrod há cerca de um século. Sua hipótese de herança autossômica recessiva, de acordo com as leis de hereditariedade de Mendel, poderia explicar a ocorrência do fenótipo de alcaptonúria na população, foi baseada na sua investigação de consanguinidade e distribuição dos casos dentro das famílias. Garrod também percebeu que as manifestações de alcaptonúria eram congênitas, presentes no nascimento, e não por condições e fatores ambientais (Baric et al, 2001).

Os EIM compõem um vasto grupo de distúrbios genéticos ocasionados por deficiências enzimáticas específicas, ou decorrentes de falhas no transporte de proteínas, que podem levar ao acúmulo de substâncias normalmente presentes em pequenas quantidades, a deficiência de produtos intermediários, deficiência de produtos finais específicos ou ainda o excesso prejudicial de vias metabólicas acessórias (Souza, 2007). Ou ainda resultam a partir de uma deficiência ou hiperatividade da enzima, ou uma deficiência do co-fator necessária para atividade enzimática, uma anormalidade da degradação ou nos processos de transporte que leva ao acúmulo dos metabólicos (Erez et al., 2011).

Dependendo da importância da rota afetada, este bloqueio repercute de forma clínica variável, geralmente provocando sintomatologia grave, que na maioria das vezes afeta o sistema nervoso central (SNC) (Scriver et al., 2001), podendo ser diagnosticadas pela análise do plasma sanguíneo e urina (Saudubray, 2009).

Até o momento foram descritos mais de 500 erros inatos do metabolismo (EIM) (Raghuveer et al., 2006). Em conjunto apresentam incidência estimada em 1:500 nascidos vivos (Touati et al., 2003).

1.2 Tirosina

A tirosina é um aminoácido semi-essencial classificado no grupo dos aromáticos, derivado da hidrólise da dieta ou proteína tecidual ou ainda hidroxilação da dieta ou fenilalanina tecidual, é o ponto de partida para síntese das catecolaminas (norepinefrina, epinefrina e dopamina), hormônio da tireóide e pigmentação de melanina (Mitchell, et al, 2001).

Apresenta dois principais destinos metabólicos, síntese proteica ou degradação de fumarato e acetoacetato (Held, 2006).

As concentrações plasmáticas de tirosina variam entre 0,3 mM e 3,0 mM em pacientes não tratados enquanto que as concentrações normais são inferiores a 0,1 mM (Valikhani et al., 2006; Held, 2006).

A tirosina é metabolizada através de um processo de 5 passos: onde fenilalanina é metabolizada, formando a tirosina pelo ação da enzima fenilalanina hidroxilase, que com ação da tirosina aminotransferase (TAT) a tirosina é transformada em ácido 4-hidroxifenilpirúvico (4HPP) que metabolizado pela 4HPP dioxigenase (4HPPD) forma o ácido homogentísico (HGA), catabolizado pela HGA oxidase formando ácido maleilacetoacético (MAA), metabolizado pela MAA isomerase, que possui como produto o ácido fumarilcetoacético (FAA) que por fim forma o fumarato e o acetoacetato como produto final, catabolizado pela fumarilacetoacetato hidrolase (FAH) (Mitchell et al, 2001).

1.3 Tirosinemia

Deficiências hereditárias de enzimas envolvidas no catabolismo da tirosina levam a hipertirosinemia. A tirosinemia é uma doença rara e causada por uma mutação em um dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela metabolização da tirosina, (Tsai et al., 2006) desta forma o organismo não consegue metabolizar o aminoácido tirosina presente no citoplasma de hepatócitos, a tirosina é encontrada na maioria das proteínas animais e vegetais, pelo fato de as enzimas não serem produzidas em quantidade suficiente, ou que a sua função seja prejudicada (Nakamura et al, 2007), ocorrendo acúmulo da tirosina ou de seus metabólitos tóxicos, chamado de hipertirosinemia, em órgãos como fígado, rins e SNC, levando às lesões em alguns órgãos. (Aydin et al., 2003; Nakamura et al, 2007).

A hipertirosinemia é classificada em agudo ou crônico. As manifestações ocorrentes da doença são problemas hepáticos e renais, podendo ser agudo ou crônico, e crises neurológicas (Aydin et al., 2003). Outras manifestações clínicas que podem ocorrer são pancreatite, podendo muitas vezes nem ser percebidas pelo paciente, muitas crianças apresentam hipoglicemia, cardiomiopatia, macrossomia, hepatomegalia, hipertrofia cardíaca, hiperinsulinimismo e ataxia (Macvicar et al, 1990; Culic et al., 2011).

Têm sido identificados em humanos quatro tipos distintos de doença autossomal recessiva: tirosinemia tipo I (deficiência da fumarilcetoacético hidrolase (FAH)), tirosinemia tipo II (deficiência da tirosina aminotransferase (TAT)), tirosinemia tipo III (deficiência da 4-hidrofenilpirúvico dioxigenase (4-HPPD)) e tirosinemia transitória (Scriver e Rosenberg, 1973). Representados na figura 1.

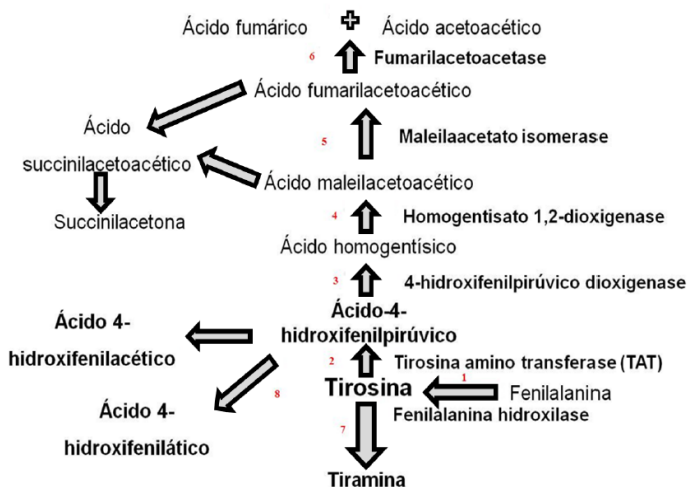


Figura 1 Catabolismo da tirosina. As enzimas 7 e 8 ainda não foram identificadas. Adaptado de Mitchell et al., 2001.

1.3.1 Tirosinemia Tipo II (deficiência da tirosina aminotransferase (TAT))

1.3.1.1 Histórico

A tirosinemia tipo II foi primeiramente descrita por Richner em 1938 e mais tarde por Hanhart em 1947 como uma síndrome oculocutâneo (Aydin et al., 2003; Tsai et al., 2006; Valikhani et al., 2006; Culic et al., 2011). A tirosinemia tipo II (síndrome de Richner-Hanhart) é uma doença autossômica recessiva, rara em que os níveis aumentados de tirosina no plasma estão associados a danos neurológicos (Macasai et al, 2001; Leib et al, 2005; Charfeddine et al., 2006 ; Tsai et

al., 2006). As concentrações plasmáticas de tirosina variam entre 0,3mM e 3,0mM em pacientes não tratados, enquanto que as concentrações normais são inferiores a 0,1mM (Macasai et al, 2001; Mitchell et al, 2001; Held, 2006).

Tirosinemia tipo II ocorre devido a uma mutação no gene TAT, que (Sivaraman e Kirsch, 2006; Scott, 2006), produzem uma enzima TAT com atividade diminuída ou inexistente (Legarda et al., 2011). O gene para a TAT que compreende 454 aminoácidos está localizado no cromossomo 16 (q22.1- q22.3) (Charfeddine et al., 2006). Ela estende-se sobre 10,9 kb e dispõe 12 exons. As mutações no gene TAT foram identificadas por causar tirosinemia tipo II, até agora, 18 mutações diferentes na região de codificação do gene TAT foram descritos (Culic et al., 2011). As mutações podem acontecer em diferentes exons levando a perda parcial ou total da enzima, que por sua vez vai configurar o fenótipo da doença sendo mais moderada ou severa (Charfeddine et al., 2006; Legarda et al., 2011).

A incidência é menor que 1 em 250.000 (De Andrade et al., 2012). Olhos avermelhados e presença de cristais, pele hiperkeratóticas e sinais neurológicos são sintomas da doença (Viglizzo et al., 2006).

1.3.1.2 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas associadas à tirosinemia tipo II envolvem lesões oculares, lesões cutâneas, erosões dolorosas sobre dedos das mãos e plantas dos pés e alterações neurológicas (Madan e Gupta, 2005; Charfeddine et al., 2006; Held, 2006). O envolvimento do SNC é variável, sendo que o retardo mental é grave por ocasionar uma diminuição da inteligência, associado com microcefalia, tremor, ataxia, distúrbios na coordenação motora, déficit de linguagem e convulsões (Mitchell et al., 2001).

As lesões oculares podem gerar conjuntivites e ulcerações nas córneas, que podem causar uma diminuição da visão e glaucoma (Madan e Gupta, 2005; Mitchell et al., 2001), essas lesões oculares caracterizam-se por fotofobia, lacrimejamento, vermelhidão e dores intensas (Rabinowitz et al., 1995; Scott, 2006). O mecanismo das lesões oculares e cutâneas na tirosinemia tipo II está relacionada ao envolvimento de cristais intracelulares de tirosina e ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória acentuada (Held, 2006; Sivaraman e Kirsch, 2006). As lesões cutâneas são do tipo hiperkeratóticas e atingem

as plantas dos pés e as palmas das mãos nesses indivíduos (Valikhani et al., 2006).

As alterações neurológicas variam desde leve decréscimo na inteligência até retardo mental severo associado à macrocefalia, hiperatividade, automutilação, distúrbios motores e na fala (Mitchell, et al, 2001). Acredita-se que os altos níveis de tirosina sejam responsáveis pelo comprometimento do SNC na tirosinemia tipo II (Held, 2006). O envolvimento do SNC é variável e pode incluir o atraso mental, tremor, ataxia e convulsões (Macasai et al., 2001). Achados neuropatológicos de pacientes com tirosinemia incluem atraso na mielinização (Mitchell et al., 2001).

A elevada excreção urinária de tirosina e seus metabólitos (ácido 4-hidroxifenilpirúvico, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 4-hidroxifenilático, N-acetiltirosina e 4-tiramina) também caracterizam a tirosinemia tipo II (Mitchell et al., 2001; Tsai et al., 2006). Qualquer deficiência do catabolismo, nas enzimas envolvidas irá conduzir a um acúmulo de tirosina em tecidos, líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue e urina levando a formação de cristais característicos na pele e olhos de pacientes com tirosinemia tipo II (Scott, 2006).

1.3.1.3 Diagnóstico e Tratamento

A tirosinemia tipo II caracteriza-se por elevadas concentrações de tirosina no plasma, frequentemente mais do que 10 vezes que o normal (Aydin et al., 2003).

O diagnóstico da tirosinemia tipo II consiste tanto na dosagem de altas concentrações plasmáticas e urinárias de tirosina, bem como na detecção dos altos níveis de metabólitos secundários na urina.

O diagnóstico pode ser confirmado por análise da atividade enzimática da TAT em biopsia hepática ou por análise de mutações no DNA (Mitchell, et al, 2001; Leib et al, 2005; Legarda et al., 2011).

O uso de espectrometria de massa para o diagnóstico de EIM tem um potencial para expandir o painel de triagem neonatal para incluir um vasto número de doenças (Campos, 2011).

O tratamento consiste em restrição dietética de tirosina e fenilalanina para amenizar as lesões na pele e lesões oculares dos pacientes com tirosinemia tipo II (Held, 2006; Culic et al., 2011). As lesões nos olhos e pele resolvem-se após poucas semanas de terapia dietética, porém ocorre a reincidência com a interrupção da dieta.

Retinóides oral podem melhorar as lesões na pele sem mudanças no nível de tirosina. O tratamento para lesões nos olhos com esteróides sistêmicos deve ser evitado porque a doença pode ser agravada com essa terapia (Sayar et al, 1988). Até o momento, não é conhecido quando o controle deve ser iniciado e terminado, e quais as concentrações plasmáticas de tirosina apropriadas para evitar os problemas neurológicos (Mitchell, et al, 2001; Held, 2006).

Conforme visto em estudos anteriores os EIM provocam alguns danos no metabolismo energético, como na fosforilação oxidativa, provocando problemas cerebrais, pelo déficit de ATP (Sgaravatti et al, 2009).

Outros estudos confirmam a presença de desordens na avaliação energética, como creatina quinase e déficit no transporte de glicose, não ocasionam má formação cerebral, mas sim um dano moderado que pode evoluir. Distúrbios na neurotransmissão também são afetados podendo produzir um severo distúrbio mental e motor. Excesso de subprodutos do catabolismo da tirosina podem provocar desordem no ciclo da uréia, acidúrias orgânicas, diferentes danos mentais dependendo do nível e duração da exposição às toxinas (García-Cazorla et al, 2009).

2.0 METABOLISMO ENERGÉTICO

O cérebro possui uma intensa atividade metabólica, e suas reservas energéticas são pequenas em relação a sua demanda, assim, há a necessidade relevante de substratos energéticos para esse órgão, sendo a glicose o principal deles (Dickinson, 1996). O tecido cerebral depende de um fornecimento contínuo de energia e, portanto, é extremamente vulnerável á falta de energia, e assim suscetível a danos em situações de metabolismo energético reduzido (Bolaños et al., 2009; Federico et al., 2012).

A glicólise e a fosfoliração oxidativa são extremamente importantes para a produção de energia no cérebro. A glicose entra no ciclo de Krebs sob a forma de acetil-CoA, que então é oxidada completamente a CO_2 . No cérebro a fosforilação oxidativa fornece mais de 95% do ATP sintetizado (Raichle, 2006).

A glicose captada pelo cérebro é fonte de carbono para a síntese de diversas outras biomoléculas essenciais ao organismo como (por exemplo, neurotransmissores), o que reforça a ideia de que a utilização

da glicose não está atrelada somente a produção de energia (Nicholls e Ferguson, 2001).

A ação combinada do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa é responsável pela maior parte da produção de ATP gerada pelos seres humanos (Sgaravatti et al, 2009).

Uma função mitocondrial adequada é necessária para a homeostase metabólica, e envolve regulação cuidadosa da atividade metabólica de múltiplas enzimas (Newman et al., 2012).

Certos números de funções celulares essenciais têm lugar nas mitocôndrias. Estes incluem as vias reguladoras do metabolismo intermediário, metabolismo de esteróides, a biossíntese de aminoácidos, oxidação de ácidos graxos, e a apoptose (Tyler, 1992; Morán et al., 2012). As mitocôndrias têm sido descritas como "os motores da célula" porque ligam as atividades de energia, liberação de transporte de elétrons e bombeamento de prótons, com o processo de conservação de energia da fosforilação oxidativa, a fim de aproveitar o valor dos alimentos, na forma de ATP (Cadenas e Davies, 2000).

No entanto, a principal função mitocondrial é a produção de ATP, a principal fonte de energia das células (Yu-Wai-Man et al, 2012; Federico et al., 2012). As mitocôndrias são organelas que contém as enzimas envolvidas no ciclo de Krebs, sendo uma delas a succinato desidrogenase presente na membrana interna. Também se encontram na membrana interna da mitocôndria os complexos enzimáticos envolvidos no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa (Murray, 2002; Devlin, 2008; Horn & Barrietos, 2008).

A acetil CoA, formada pela piruvato desidrogenase a partir do piruvato, é completamente oxidada a CO_2 pelo ciclo de Krebs, através de uma série de reações, que é composta por oito passos, onde cada um é catalisado por enzimas diferentes (Lehninger et al., 2007; Berg et al., 2008). O ciclo de Krebs começa e termina com oxaloacetato, onde uma volta completa no ciclo produz duas moléculas de CO_2 , três de NADH, uma de FADH_2 e um composto de alta energia (ATP ou GTP). Contudo, durante todo o ciclo não ocorre perda de água, logo o ciclo tem que estar acoplado à cadeia respiratória, por ela ser capaz de produzir água usando NADH e FADH_2 gerados no ciclo de Krebs (Voet et al., 2002).

Uma vez que as mitocôndrias representam uma fonte e alvo de espécies reativas de oxigênio (Milner et al., 2007), a redução no metabolismo energético cerebral pode levar a diminuição na síntese de ATP, comprometendo a síntese de neurotransmissores e induzir a apoptose (Heales et al., 1999).

Não é surpreendente que as alterações mitocondriais possam promover disfunção neuronal e degeneração (Exner et al., 2012). A disfunção mitocondrial causa uma redução na produção de ATP, e indução de dano oxidativo e a propagação de precursores de morte celular. Todos estes aspectos estão interligados, de uma disfunção celular, envolvidos na patogênese de numerosas doenças neurológicas, incluindo aqueles com um grau agudo (AVC isquêmico) ou uma doença crônica (doença de Huntington). Tanto aguda como crônica, as doenças neurodegenerativas foram demonstradas envolver múltiplos desequilíbrios do metabolismo energético (Zádoriet al., 2012).

As mitocôndrias podem ter um papel importante associada ao envelhecimento, como doenças neurodegenerativas, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica. Em doenças primárias mitocondriais e neurodegenerativas, há uma forte evidência de que a disfunção mitocondrial ocorre precocemente e tem um papel principal na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas (Federico et al., 2012).

A deficiência do metabolismo energético parece estar ligada na patogênese de uma série de condições neurológicas, incluindo doenças neurodegenerativas, metabólicas (Mattson et al., 2008; Duchén, 2012). Em particular, a disfunção mitocondrial tem sido implicada na patologia da doença de Parkinson (Exner et al., 2012; Schon e Gomez, 2012).

Qualquer que seja o mecanismo, o recurso final comum de distúrbios mitocondriais é prejudicar a atividade da cadeia respiratória mitocondrial ou o fracasso da sua função, o que resulta em uma grande variedade de quadros clínicos e doenças neurodegenerativas (Federico et al., 2012).

2.1 CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

A cadeia de transporte de elétrons é composta por quatro complexos enzimáticos e dois componentes que não fazem parte dos complexos, a ubiquinona, também chamada de coenzima Q, que transporta elétrons do NADH desidrogenase (complexo I) e succinato desidrogenase (complexo II) ao ubiquinona-citocromo *c* oxidoredutase (complexo III), e o citocromo *c*, que transporta elétrons do complexo III ao citocromo oxidase (complexo IV) (Morán et al., 2012). Os elétrons

presentes nas coenzimas NADH são transferidos para o complexo I e os elétrons presentes no FADH_2 são transferidos ao complexo II (Erecinska & Dagani, 1990; Heales et al., 1999; Wallace, 1999). O último aceptor de elétrons é o oxigênio, que se reduz à água e ocorre a formação de ATP através da fosforilação do ADP, por uma operação chamada de acoplamento quimiosmótico, baseado na diferença de concentrações de prótons no espaço intermembrana e matriz mitocondrial, portanto com a volta dos prótons na matriz ocorre à produção ATP (Wallace, 1999; Murray, 2002; Voet et al., 2002).

Estes defeitos de montagem e mudanças estruturais nos complexos poderiam posteriormente levar a uma diminuição da produção de ATP e mais tardiamente o vazamento e acumulação de elétrons e espécies reativas de oxigênio, liberando o fator indutor de apoptose que acabaria por levar à morte celular e degeneração dos tecidos afetados (Mora'n et al., 2012).

Considerando que vários estudos demonstram uma associação entre altas concentrações de metabólitos acumulados em diferentes EIM e alterações no metabolismo energético em modelos animais destas doenças, este estudo visa investigar o efeito da administração aguda da L-tirosina em ratos infantis afim de melhor compreender os possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos na tirosinemia tipo II.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos da administração aguda da L-tirosina sobre o metabolismo energético em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos de 10 dias.

3.2. Objetivos Específicos

- a) atividade da citrato sintase;
- b) atividade da malato desidrogenase;
- c) atividade da succinato desidrogenase;
- d) atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) no Laboratório de Bioenergética. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo 42/2010.

4.1 Desenho Experimental

Animais: Foram utilizados 14 ratos machos com 10 dias de vida, da linhagem Wistar, obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram acondicionados em 5 animais por caixa, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 às 19:00) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

Administração da tirosina: A L-Tirosina foi dissolvida em solução salina (pH foi ajustado para 7,4) e o equivalente a 500 mg/kg de L-tirosina livre foi administrada por via intraperitoneal (i.p.). Esta dose foi escolhida de forma a obter as concentrações de tirosina cerca de 10 vezes o normal, 1 hora após a administração (Bongiovanni et al., 2003; Morre et al., 1980), que são variações de concentração semelhante à tirosina plasmática observada em pacientes afetados pela tirosinemia tipo II (Mitchell et al., 2001).

Preparação do tecido: Uma hora após a administração os ratos foram sacrificados por decapitação, o cérebro foi removido e as estruturas isoladas. A seguir, o córtex cerebral, hipocampo e estriado foram homogeneizados em tampões específicos de cada técnica. O homogeneizado obtido foi levado à centrifugação por rotação e tempo segundo protocolos específicos para cada técnica. O sobrenadante obtido foi separado e armazenado a -70°C . A proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) usando albumina sérica bovina como padrão.

4.2 Dosagens Bioquímicas

Atividade da citrato sintase: A atividade da enzima citrato sintase foi avaliada em um meio de incubação contendo 5',5''-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) 0,1 mM, ácido oxaloacético 0,2 mM, Triton X-100 0,1 % e acetil-CoA 0,1 mM, em um tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. A redução do DTNB a TNB foi medida espectrofotometricamente a 412 nm por 5 minutos a 25°C (Srere, 1969).

Atividade da malato desidrogenase: A atividade NADH-específica da malato desidrogenase foi avaliada espectrofotometricamente conforme o método descrito por Kitto (1969). A reação foi iniciada após a adição de oxaloacetato e o consumo de NADH foi acompanhado através da redução da absorbância em 340 nm durante 3 a 5 minutos a 37°C.

Atividade da succinato desidrogenase: Para a medida da atividade da enzima succinato desidrogenase, ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM pH 7,4, Triton X-100 0,1 %, succinato de sódio 1 mM e dicloroindofenol (DCIP) 9 µM, foi adicionado na amostra contendo cerca de 80 a 140 µg de proteína. Os sistemas foram pré-incubados por 30 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foram adicionados azida sódica 4,3 mM, rotenona 7 µM, metassulfato de fenazina 1 mM e DCIP 42 µM. A redução do DCIP é determinada em 600 nm durante 5 minutos a 25°C (Fischer et al., 1985).

Atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial: A atividade do complexo I foi avaliada pelo método descrito por Cassina & Radi (1996) pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm. A atividade do complexo II foi medida pelo método descrito por Fischer e colaboradores (1985), onde a diminuição da absorbância do 2,6-DCIP em 600 nm foi usada para o cálculo da atividade do complexo II. A atividade do complexo II-III foi determinada de acordo com Fischer e colaboradores (1985) e foi baseada na redução do citocromo c acompanhando o aumento da absorbância em 550 nm durante 5 minutos a 37°C. A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com Rustin et al. (1994), e foi calculada pela diminuição da absorbância causada pela oxidação do citocromo c reduzido, medido em 550 nm.

4.3 Análise Estatística: A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Assumindo que os dados tenham uma distribuição normal, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes ou pareadas. As análises estatísticas foram feitas pelo programa SPSS versão 17.0. Onde foram consideradas diferenças significativas quando o $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

Nossos resultados demonstraram que a administração aguda de L-tirosina em cérebro de ratos com 10 dias de vida, inibiu a atividade da enzima citrato sintase, no estriado (Figura 2).

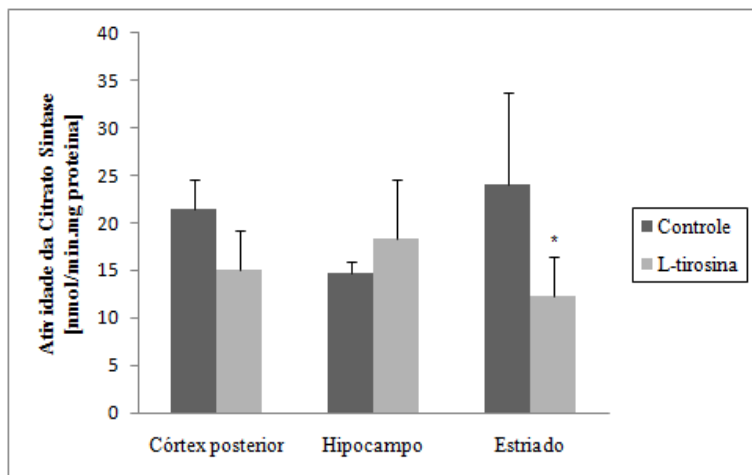


Fig. 2. Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre a atividade da enzima citrato sintase em cérebro de ratos infantis. Os valores são expressos em nmol/min.mg de proteína, média \pm S.D. (n = 7). * Diferente do controle, $p < 0,05$ (teste t de Student).

No entanto a atividade da malato desidrogenase foi aumentada no hipocampo após administração aguda de L-tirosina. (Figura 3).

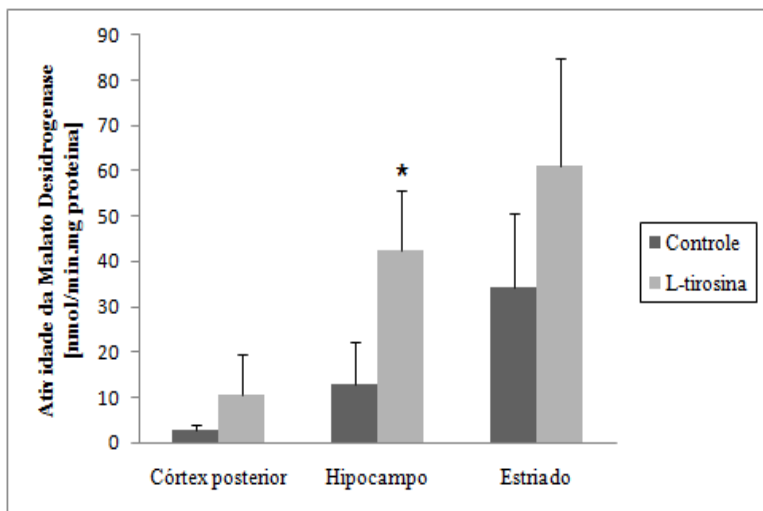


Fig. 3. Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre a atividade enzimática do malato desidrogenase em cérebro de ratos infantis. Os valores são expressos em nmol/min.mg de proteína, média \pm S.D. (n = 7). * Diferente do controle, p < 0,05 (teste t de Student).

A atividade do succinato desidrogenase avaliada após administração aguda de L-tirosina em cérebro de ratos infantis, foi aumentada no hipocampo (Figura 4).

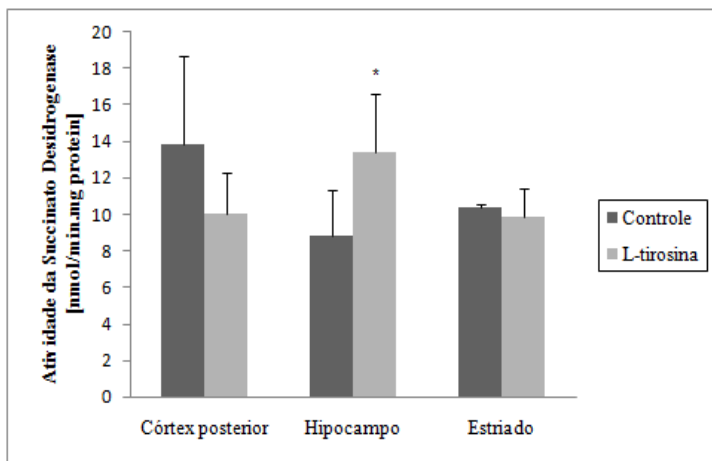


Fig. 4. Efeito da administração aguda de L-tyrosina sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase em cérebro de ratos infantis. Os valores são expressos como nmol/min.mg de proteína, média \pm S.D. (n = 7). * Diferente do controle, $p < 0,05$ (teste t de Student).

A administração aguda de L-tyrosina sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis teve sua atividade diminuída no estriado (Figura 5).

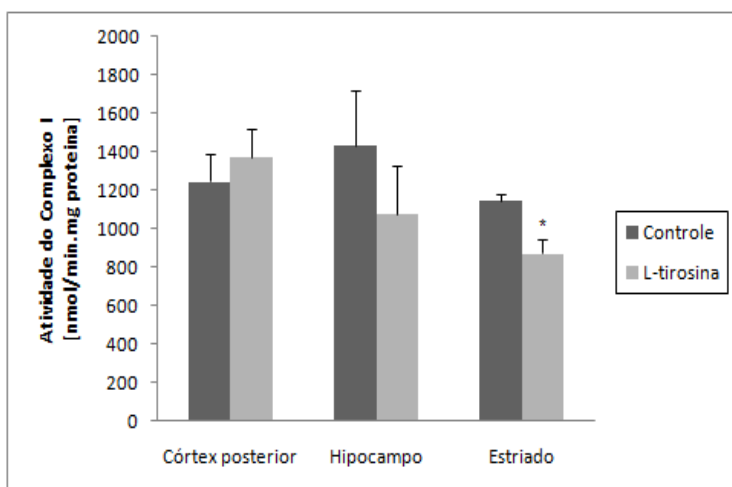


Fig. 5. Efeito da administração aguda de L-tyrosina sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis. Os

valores são expressos como nmol/min.mg de proteína, média \pm S.D. (n = 7). * Diferente do controle, $p < 0,05$ (teste t de Student).

A administração aguda de L-tirosina sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis teve sua atividade diminuída no estriado (Figura 6).

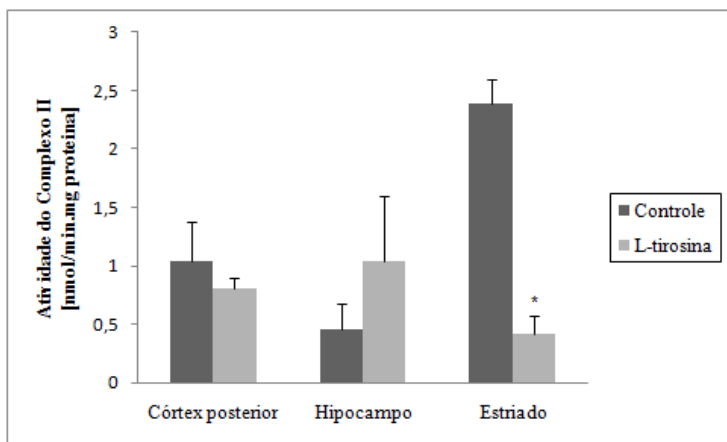


Fig. 6. Efeito da administração aguda de L-tirosina na atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis. Os valores são expressos como nmol/ min.mg de proteína, média \pm S.D. (n = 7). * Diferente do controle, $p < 0,05$ (teste t de Student).

A administração aguda de L-tirosina sobre a atividade do complexo II- III da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis teve sua atividade aumentada no hipocampo (Figura 7).

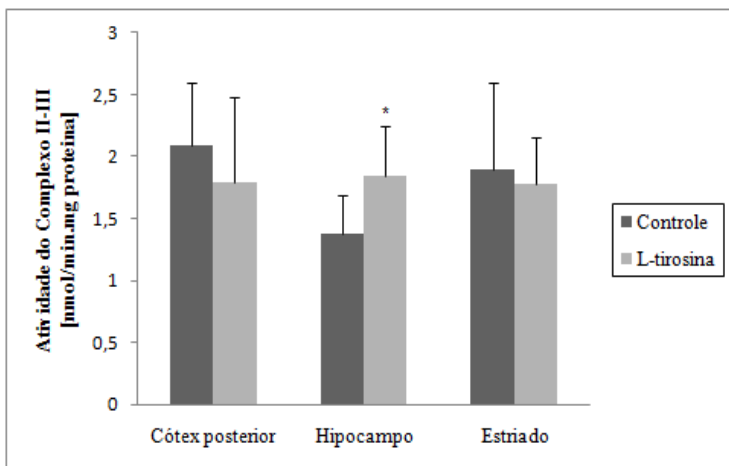


Fig. 7. Efeito da administração aguda de L-tyrosina na atividade II-III complexo da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis. Os valores são expressos como nmol/ min.mg de proteína, média \pm S.D. (n = 7). * Diferente do controle, $p < 0,05$ (teste t de Student).

No entanto a atividade do complexo IV não houve alteração em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas após administração aguda de L-tyrosina. (Figura 8).

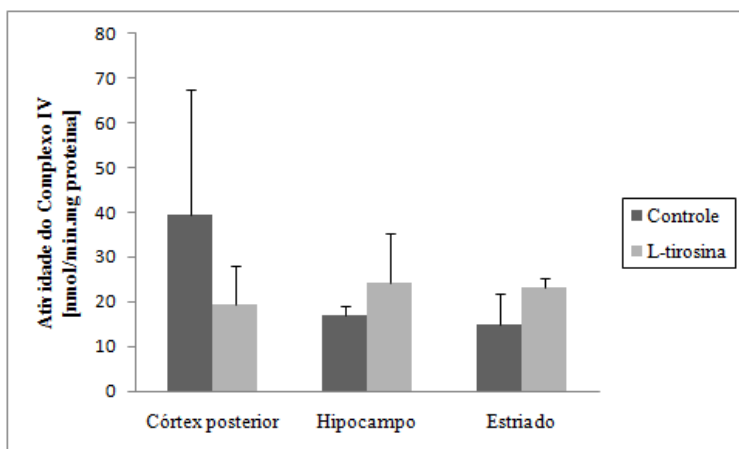


Fig. 8. Efeito da administração aguda de L-tyrosina na atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos infantis. Os valores são

expressos como nmol/ min.mg de proteína, média \pm S.D. (n = 7). * Diferente do controle, p <0,05 (teste t de Student).

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós demonstramos que a administração aguda de L-tirosina em ratos infantis inibiu a enzima citrato sintase e a atividade do complexo I e II no estriado. Também foi demonstrado que as enzimas succinato desidrogenase, malato desidrogenase e a atividade do complexo II-III foram aumentadas no hipocampo.

O desenvolvimento do SNC ocorre em fases, as quais seguem uma sequência precisa (Morgane et al., 2002). A falta de plasticidade cerebral perinatal aumenta a vulnerabilidade e experiências adversas e precoces, levando a desenvolvimento e comportamentos anormais no início da vida (Anand e Scalzo, 2000).

Slotkin et al. (2005) identificou uma fase crucial de vulnerabilidade das células neuronais, correspondentes a períodos de pico de diferenciação quando as exigências metabólicas são especialmente elevadas. O período de rápido crescimento dendrítico em cérebro de rato é entre 8 e 14 dias pós-natais (Uylings, 2000). As duas primeiras semanas após o nascimento representam um período crítico para o desenvolvimento neural em ratos. Processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte celular ocorrem no cérebro neste período (Mistretta e Bradley, 1978), enquanto que em humanos é durante os primeiros 2 a 3 anos (Uylings, 2000).

Especula-se que o grau de desenvolvimento do SNC pode ser correlacionado com níveis elevados e anormais da tirosina no plasma (Mitchell et al., 2001). A este respeito, os pacientes com tirosinemia, como muitas outras doenças metabólicas hereditárias, são sujeitos a elevados níveis de metabólitos acumulados (neste caso, a tirosina), no período pós-natal durante as fases críticas no desenvolvimento do SNC (Mitchell et al., 2001).

O envolvimento do SNC em pacientes com tirosinemia são variáveis, de retardo mental grave a ligeiras descidas de inteligência e pode estar associado à microcefalia, tremor, ataxia, distúrbios de coordenação motora fina, déficits de linguagem e convulsões (Goldsmith et al, 1973; Lemonnier et al, 1979; Macsai et al, 2001; Mitchell et al, 2001; Rabinowitz et al, 1995; Valikhani et al, 2006). No entanto, diversos grupos relataram que a tirosina administrada sistematicamente é diferencialmente distribuída entre as regiões do cérebro (Miller et al, 1985; Raichle, 2006).Tendo em vista que as enzimas succinato desidrogenase, malato desidrogenase e a atividade do complexo II-III foram aumentadas no hipocampo, sugere-se que o

aumento dessas atividades enzimáticas no hipocampo prejudique a formação da memória.

Neurônios do hipocampo proporcionam um tipo de plasticidade neuronal, que permite aquisição e separação das memórias espaçadas. Isto está em contraste com neurônios do hipocampo que são necessárias para a evocação de memórias (Ransome et al., 2012).

Dessa forma o hipocampo tanto poderia atuar como uma estação intermediária para a memória em longo prazo, ou como um sistema facilitador que seria essencial para o armazenamento das memórias em outras regiões cerebrais (Kandel et al., 2000; Ransome et al., 2012). No giro denteado no hipocampo, o nascimento e maturação celular de neurônios, ou neurogênese, ocorrem durante todo o tempo de vida de animais e seres humanos (Malberg, 2004).

Tendo em vista que a enzima citrato sintase e a atividade dos complexos I e II foram inibidas no estriado, sugere-se que a formação de memória, e os processos cognitivos possam estar prejudicados.

Sabe-se que o estriado está envolvido em uma série de funções neurológicas, incluindo formação de memórias. Sabemos também, que o estriado está ligado a uma variedade de processos cognitivos em relação à função de execução e nos processos cognitivos (Steffenach et al., 2002), e no processamento de informação relacionada com a recompensa sendo, importante para a aprendizagem baseada na recompensa (Glenn e Yang, 2012).

Diversas funções cognitivas, emocionais e motoras dependem da integridade do estriado. O primeiro é o estímulo-resposta, formação de hábito, aprendizagem processual, referência de memória, orientação egocêntrica, e aprendizagem baseada em regras. A segunda categoria de funções envolve diferentes respostas comportamentais na presença de exigências e alterações das tarefas, que podem incluir o planejamento motor e controle de correção de erros e resposta, e seleção de estratégias (Evans et al., 2012; Glenn e Yang, 2012).

Uma questão de debate entre o hipocampo e o estriado, no entanto, é como essas estruturas distintas interagem para contribuir à aprendizagem e o comportamento. Algumas pesquisas sugerem que essa interação pode ser competitiva, de modo que, quando um sistema está envolvido, pode inibir ou reduzir a ativação do outro sistema. Parte deste argumento deriva da neuroconectividade anatômica e funcional entre o hipocampo, estriado e células dopaminérgicas no mesencéfalo (Dickerson et al., 2011).

A dopamina pertence ao grupo das catecolaminas, é um importante neurotransmissor do SNC dos mamíferos, onde atua sobre o controle das funções motoras, no afeto e na integração neuroendócrina (Cooper et al., 1998). Estas catecolaminas desempenham papéis em várias funções cerebrais, como a atenção, memória, cognição, e emoção ou como o hormônio da luta ou fuga, resposta a epinefrina (Daubner et al., 2011).

A tirosina hidroxilase (TH) catalisa a conversão enzimática de L-tirosina para catecolaminas, TH é a enzima limitante da síntese de catecolaminas (Scott, 2006). As catecolaminas, dopamina epinefrina e norepinefrina são produtos da via, sendo neurotransmissores muito importantes em ambos os SNC e periférico (Daubner et al., 2011).

A atividade da (TH) está presente em ambos os terminais noradrenérgicos e dopaminérgicos do hipocampo (Schmidt e Bhatnagar, 1979). A TH está expressa em neurônios, presentes no corpo estriado de roedores, macacos, e seres humanos (Busceti et al., 2012). A TH já está presente no cérebro dos ratos ao 14-15 dias de gestação (Daikoku et al., 1986), mas cerca de 95% da sua atividade total surge após o nascimento (Coyle e Axerold, 1972).

No entanto sua distribuição não está bem caracterizada, infelizmente não há estudos que comparam diretamente o estriado e hipocampo ventral, onde a inervação mais densa é a catecolaminérgica (Gasbarri et al, 1994; Palkovits et al, 1979).

Bacopoulos e Bhatnagar (1977) investigaram a relação entre a TH e a atividade e concentração ou renovação das catecolaminas em várias regiões do sistema nervoso. Sendo que a quantidade de TH pode ser considerada um índice da renovação das catecolaminas no encéfalo, e regiões que contêm terminais nervosos dopaminérgicos, a atividade da TH é um índice confiável de renovação desse neurotransmissor.

A TH pode ser um biomarcador de diminuição da síntese de dopamina central, e suas alterações no metabolismo da dopamina podem contribuir para uma diminuição de neurotransmissores (Felger et al., 2012). O número de neurônios TH foi reduzido no estriado de indivíduos afetados pela doença de Huntington (Busceti et al., 2012).

Bongiovanni et al. (2012) demonstraram que uma redução dos níveis de tirosina, em condições normais, diminui a hidroxilação de tirosina *in vivo* no hipocampo ventral e, conseqüentemente, existe um aumento nos níveis de tirosina aumentando conjuntamente a hidroxilação de tirosina. Portanto, sugere-se que o aumento do metabolismo energético no hipocampo, pode ser mediado pelo aumento

da hidroxilação de tirosina e como consequência disto provavelmente ocorre um aumento dos níveis de catecolaminas.

Estudos demonstraram que gânglios basais, composto pelo globo pálido, corpo estriado e substância nigra, correspondem a uma região do cérebro afetada na tirosinemia tipo II, causando astrocitose, mielinização tardia e espongirose (divisão da mielina e vacuolização) (Sener, 2005). Em estágios mais avançados da doença, estas alterações na concentração da mielina pode diminuir a produção aeróbica de ATP (Morelli et al., 2011) pelas enzimas do metabolismo energético e complexos da cadeia de transporte de elétrons.

Outros estudos demonstraram que os elevados níveis de tirosina no plasma pode afetar o metabolismo da dopamina e da serotonina no cérebro (Stoerner et al., 1980).

Outras hipóteses sugerem que na tirosinemia tipo II, estas mudanças provavelmente resultam do efeito direto de tirosina nos neurônios estriatais estimulando a produção de dopamina, num curto período de tempo. Embora um recente estudo *in vitro* com a doença de Parkinson demonstrou que a dopamina induz a despolarização da membrana e uma perda da capacidade de fosforilação de modo dose dependente em mitocôndria isolada de cérebro de rato, durante a incubação *in vitro*. Além disso, há um aumento da densidade dos neurônios, em amostras de estriado, de pacientes com a doença de Parkinson (Buceti et al., 2012).

A dopamina (DA) endógena em neurônios da substância nigra pode sofrer auto-oxidação ou oxidação catalisada por uma enzima produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO), sugere-se que os efeitos do metabolismo da dopamina e serotonina, podem não estar ligados diretamente ao desenvolvimento da tirosinemia tipo II (Jana et al., 2011). Sendo assim de acordo com a literatura, ratos com 10 dias de idade submetidos à administração aguda de L-tirosina, podem desenvolver um déficit cognitivo.

Outros estudos demonstraram uma diminuição no metabolismo energético em cérebro de ratos após administração aguda de L-tirosina, como um decréscimo da piruvato-quinase e creatina-quinase nas frações citosólica e mitocondriais em córtex de ratos jovens após a administração aguda de L-tirosina (De Andrade et al., 2011; 2012). Ferreira et al. (2012) demonstraram que após a administração aguda de L-tirosina em ratos de 30 dias de idade ocorre uma inibição da enzima malato desidrogenase, citrato sintase, complexos II, II-III e IV em córtex posterior.

A atividade da enzima succinato desidrogenase e complexo I foram inibidos em córtex posterior e aumentados em estriado, sugerindo uma alteração no metabolismo energético provavelmente mediado pelo estresse oxidativo.

Defeitos na fosforilação oxidativa podem levar a uma grande variedade de problemas, contribuindo para uma diversidade de anormalidades fisiológicas (Garcia-Cazorla et al., 2009).

Em conclusão, os nossos resultados indicam que uma alteração no metabolismo energético do hipocampo e corpo estriado pode levar a danos na aquisição, recuperação, consolidação e de armazenamento de memória, e nos processos cognitivos após a administração aguda de L-tirosina. Assim, nossos resultados contribuem para um melhor entendimento da fisiopatologia da hipertirosinemia.

7. REFERÊNCIAS

- Anand JS, Scalzo FM. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Biology of the Neonate Review*. 2000; 69-82-77.
- Aydin OF, Zorlu P, Tezic BKT, Eken A. Two siblings with tyrosinaemia type 2. *Eur J Pediatr* . 2003; (162):81-83.
- Bacopoulos NG, Bhatnagar RK. Correlation between tyrosine hydroxylase activity and catecholamine concentration or turnover in brain regions. *J Neurochem*. 1977; (29);639-643.
- Baric I, Furnic K, Hoffmann GF. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. *Croatian Medical Journal*. 2001; (42):379-383.
- Berg MJ, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara. 2008. 1114 p. 6. ed.
- Bolaños JP, Moro MA, Lizasoain I, Almeida A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; (61):1299-1315.
- Bongiovanni R, Yamamoto BK, Simpson C, Jaskiw GE. Pharmacokinetics of systemically administered tyrosine: a comparison of serum, brain tissue and in vivo microdialysate levels in the rat. *Jou of Neuroch*. 2003; (87):310-317.
- Bongiovanni R, Kyser AN, Jaskiw GE. Tyrosine depletion lowers in vivo DOPA synthesis in ventral hippocampus. *European Journal of Pharmacology*. 2012; (696):70-76.
- Busceti CL, Bucci B, Molinaro G, Di Pietro P, Zangrandi L, Gradini R, Moratalla R, Battaglia G, Bruno V, Nicoletti F, Fornai F. Lack or Inhibition of Dopaminergic Stimulation Induces a Development Increase of Striatal Tyrosine Hydroxylase- Positive Interneurons. *Plos One*. 2012; (7):1-9.
- Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad. Biol. Med*. 2000; (29):222-230.

- Campos DH. Tamiz de los errores innatos del metabolismo por espectrometría de masas en tándem: principales biomarcadores. *Rev Med Chile*. 2011; (139):1356-1364.
- Cassina A, Radi R. Differential inhibitory Action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys*. 1996;(328): 309-316.
- Charfeddine C, Monastiri K, Mokni M, Laadjimi A, Kaabachi N, Perin O, Nilges M, Kassar S, Keirallah M, Guediche M.N, Kamoun M.R, Tebib N, Ben Dridi M.F, Boubaker S, Osman AB, Abdelhak S. Clinical and mutational investigations of tyrosinemia type II in Northern Tunisia: Identification and structural characterization of two novel TAT mutations. *Molec Genet and Metab*. 2006; (88):184-191.
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. The biochemical basis of neuropharmacology. New York. Oxford University Press. 1998.
- Coyle JT, Axelrod J. Tyrosine hydroxylase in rat brain: developmental characteristics. *Journal of Neurochemistry*. 1972; (19):1117-1123.
- Culic V, Betz RC, Refke M, Fumic K, Pavelic J. Tyrosinemia type II (Richner-Hanhart syndrome): A new mutation in the TAT gene. *European Journal of Medical Genetics*. 2011; (54):205-211.
- Daikoku S, Kawano H, Okamura Y, Tokuzen M, Nagatsu I. Ontogenesis of immunoreactive tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat hypothalamus. *Brain Res*. 1986; (393): 85-98.
- Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2011; (508):1-12.
- De Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM. Tyrosine impairs enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of rats. *Mol. Cell Biochem*. 2012. [Epub ahead of print]

- De Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Funchal C, Dutra Filho CS, Wannmacher CM. Tyrosine inhibits creatine kinase activity in cerebral cortex of young rats. *Metab. Brain Dis.* 2011; (26):221-227.
- Devlin TM. Manual de bioquímica: com correlações clínicas. Edgard Blücher, São Paulo, pp. 27- 31. 2008.
- Dickerson KC, Li J, Delgado MR. Parallel contributions of distinct human memory systems during probabilistic learning. *Neuroimage.* 2011; (55):266-276.
- Dickinson CJ, Cerebral Oxidative Metabolism in Hypertension. *Clinical Science.* 1996; 539-550.
- Erecinska M, Silver IA. Ions and energy in mammalian brain. *Progress in Neurobiology.* 1994; (43):37-71.
- Erecińska M, Dagani F. Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. Effects of K⁺, Na⁺, and adenosine triphosphate in isolated brain synaptosomes. *J Gen Physiol.* 1990; (95):591-616.
- Erez A, Shchelochkov OA, Plon SE, Scaglia F, Lee B. Insights into the Pathogenesis and Treatment of Cancer from Inborn Errors of Metabolism. *The American Journal of Human Genetics.* 2011; (88):402-421.
- Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The Embo Journal.* 2012; (31):3038-3062.
- Federico A, Cardaioli E, Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences.* 2012; (322):254-262.
- Felger JC, Li L, Marvar PJ, Woolwine BJ, Harrison DG, Raison CL, Miller AH. Tyrosine metabolism during interferon-alpha administration: Association with fatigue and CSF dopamine concentrations. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2012; 1-8.

- Ferreira GK, Silva MC, Gonçalves CL, Silva JV, Scaini G, Ghedim FV, Deroza PF, Zugno AI, Pereira TCB, Oliveira GMT, Kist LW, Bogo MR, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. L-Tyrosine administration increases acetylcholinesterase activity in rats. *Neurochemistry International*. 2012; 1-5.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985 ; (153):23-26.
- García-cazola A, Wolf IN, Serrano M, Moog U, Perez-dueñas B, Póo P, Pineda M, Campistol J, Hoffmann GF. Mental retardation and inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis*. 2009; (32):599.
- Gasbarri A, Verney C, Innocenzi R, Campana E, Pacitti C. Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study *Brain Res*. 1994;(668): 71-79.
- Glenn AL, Yang Y. The Potential Role of the Striatum in Antisocial Behavior and Psychopathy. *Biol Psychiatry*. 2012; (72):817-822.
- Goldsmith LA, Kang E, Bienfang DC, Jimbow K, Gerald P, Baden HP. Tyrosinemia with plantar and palmar keratosis and keratitis. *J. Pediatr*. 1973; (82):798-805.
- Heales SRJ, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochimica et Biophysica acta*. 199; (14):215-228.
- Held PK. Disorders of Tyrosine Catabolism. *Mol. Genet. Metab*. 2006; (88):103-106.
- Horn D, Barrientos A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *Iubmb Life*. 2008; (60):421-429.
- Jana S, Sinha M, Chanda D, Roy T, Banerjee K, Munshi S, Patro BS, Chakrabarti S. Mitochondrial dysfunction mediated by quinone oxidation products of dopamine: Implications in dopamine

- cytotoxicity and pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; (1812):663-673.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Fundamentos da neurociência e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000; 591 p.
- Kitto GB. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol* XIII. 1969; 106-116.
- Legarda M, Wlodarczyk K, Lage S, Andrade F, Kim G, Bausch E, Scherer G, L Aldamiz-Echevarria LJ. A large TAT deletion in a tyrosinaemia type II patient. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011; (104):407- 409.
- Lehninger AL; Nelson DL; Cox MM. Princípios de bioquímica. Sarvier, São Paulo. 2007; (4):203-206.
- Leib SR, Mcguire TC, Prieur DJ. Comparison of the Tyrosine Aminotransferase cDNA and Genomic DNA Sequences of Normal Mink and Mink Affected with Tyrosinemia Type II. *Journal of Heredity*. 2005; (96):302-309.
- Lemonnier F, Charpentier C, Odievre M, Larregue M, Lemonnier A. Tyrosine aminotransferase isoenzyme deficiency. *J. Pediatr*. 1979; (94):931-932.
- Lowry OH. Rosebough, N.G., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951; (193):265-275.
- Macasai MS, Terry L, Schwartz MD, Hinkle D, Hummel MB, Mulhern MG, Rootman D. Tyrosinemia Type II: Nine Cases of Ocular Signs and Symptoms. Elsevier Science Inc. 2001; (132):522-527.
- Macvicar D, Dicks-mireaux C, Leonard JV, Wight DG. Hepatic imaging with computed tomography of chronic tyrosinemia type I. *Br J Radiol*. 1990; 605-63.

- Madan V, Gupta U. Tyrosinaemia type II with diffuse plantar keratoderma and self-mutilation. *Clinical dermatology*. 2005; (31):54-56.
- Malberg JE. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *Rev Psychiatr Neurosci* . 2004; (29):196-205.
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria In Neuroplasticity and Neurological Disorders. *Neuron*. 2008; (60):748-766.
- Milner PI, Wilkins RJ, Gibson JS. The role of mitochondria reactive oxygen species in pH regulation in articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007; (15):735-742.
- Mistretta CH M, Bradley RM. Effects of early sensory experience on brain and Behavioral development. *Studies on the development of behavior and nervous system*. New York: Academic Press. 1978; 215-246.
- Mitchell GA, Grompe M, Lambert M, Tanguay RM, Hypertyrosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill. 2001; (8):1977-1982.
- Molloy GR, Wilson CD, Benfield P, Vellis J, Kumar S. Rat brain Creatine Kinase Messenger RNA levels are high in Primary Cultures of Brain Astrocytes and Oligodendrocytes and Low in Neurons. *J. Neurochem*. 1992; (59):1925-1931.
- Mora'n M, Moreno-Lastres D, Marín-Buena L, Arenas J, Martín MA, Ugalde C. Mitochondrial respiratory chain dysfunction: Implications in neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012; (53):595-609.
- Morelli A, Ravera S, Panfoli I . Hypothesis of an energetic function for myelin. *Cell Biochem. Biophys*. 2011; (61):179-187.

- Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and the developing central nervous system. In: Isaacson RL, Jensen KF, editors. *The vulnerable brain: nutrition and toxins*, New York: Plenum Publishing Corporation. 2002; 3-44.
- Morre MC, Hefti F, Wurtman RJ. Regional tyrosine levels in rat brain after tyrosine administration. *Journal of Neural Transmission*. 1980;(49): 45-50.
- Murray RK, Harper: bioquímica 9 ed. Atheneu, São Paulo, pp. 102 – 105. 2002.
- Nakamura K; Tanaka Y; Mitsubuchi H; Endo F. Animal Models of Tyrosinemia. *The Journal of Nutrition*. 2007; 137: 1557.
- Newman JC, He W, Verdin E. Mitochondrial Protein Acylation and Intermediary Metabolism: Regulation by Sirtuins and Implications for Metabolic Disease. *JBC Papers in Press*. 2012; (18):1-14.
- Nicholls DG, Ferguson ST. *Bioenergetics 3*. Academic Press, London 2th ed 2001.
- Palkovits M, Palkovits L, Zaborszky MJ, Brownstein MI, Fekete JP, Herman B, Kanyicska JR. Distribution of norepinephrine and dopamine in cerebral cortical areas of the rat *Brain Res. Bull*. 1979; (4):593-601.
- Rabinowitz LG, Williams RL, Anderson CE, Mazur A, Kaplan P. Painful keratoderma and photophobia: hallmarks of tyrosinemia type II. *J.Pediatr*. 1995; (126):266-269.
- Raghuveer TS, Garg U, Graf W D. Inborn Errors of Metabolism in Infancy Sancar A, Lindsey-Boltz LA, U'nsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian Dna repair and the dna damage Checkpoints. *Annu. Rev. Biochem*. 2006; (85):73:39.
- Raichle ME. The brain's dark energy. *Science*. 2006; (314):1249-1250.

- Ransome MI, Renoir T, Hannan AJ. Hippocampal Neurogenesis, Cognitive Deficits and Affective Disorder in Huntington's Disease. *Neural Plasticity*. 2012; 1-7.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*. 1994; (228):35-51.
- Saudubray JM. Neurometabolic disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2009; (32):595-596.
- Sayar RB, Domurus VD, Schäfer HJ; Beckenkamo G. Clinical picture and problems of keratoplasty in Richner-Hanhart syndrome (tyrosinemia type II). *Ophthalmologica*. 1988; (1):197.
- Schlegel J, Zurbriggen B, Wegmann G, Wyss M, Eppenberger H, Wallimann T. Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structurefunction relationships. *The Jour of Biolog Chemis*. 1988; (264):16942-16953.
- Schon EA, Gomez EA. Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2012; 2-11.
- Scimeca JM, Badre D. Striatal Contributions to Declarative Memory Retrieval. *Neuron*. 2012; (75):380-392.
- Scott, CR. The genetic tyrosinemias. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet*. 2006; (412):121-126.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle, D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. 2001; (8):3-45.

Scriver CR; Rosenberg LE. Amino Acid Metabolism and Its Disorders. WB Sainders. 1973; 25-28.

Sener RN. Brain magnetic resonance imaging in tyrosinemia. Acta. Radiol. 2005; (46):618-620.

Sgaravatti AM, Magnusson AS, Oliveira AS, Rosa AP, Mescka CP, Zanin FR, Pederzolli CD, Wyse ATS, Wannmacher CMD, Wajner M, Dutra-filho CS. Tyrosine administration decreases glutathione and stimulates lipid and protein oxidation in rat cerebral cortex. Metab Brain Dis. 2009; (24):416.

Sgaravatti AM, Vargas BA, Zandoná BR, Deckmann KB, Rockenback FJ, Moraes TB, Monserrat JM, Sgarbi MB, Pederzolli CD, Wyse ATS, Wannmacher CMD, Wajner M, Dutra-filho CS. Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats. Int J Dev Neurosci. 2008;(26): 553.

Sivaraman S, Kirsch JF. The narrow substrate specificity of human tyrosine aminotransferase the enzyme deficient in tyrosinemia type II. FEBS Journal. 2006; (273):1920–1929.

Slotkin TA, Oliver CA, Seidler FJ. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. Dev. Brain Res. 2005; (180):157- 172.

Souza ICN. Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento. Revista Paraense de Medicina. 2007; (21):23-28.

Srere PA. Citrate synthase. Methods in Enzymology . 1969; (3):11-13.

Steffenach HA, Sloviter RS, Moser EI, Moser M. Impaired retention of spatial memory after transection of longitudinally oriented axons of hippocampal CA3 pyramidal cells. Pnas. 2002; (99):3194-3198.

Stoerner JW, Butler IJ, Morriss JR, FH, Howell Jr RR, Seifert Jr WE, Caprioli RM, Adcock EW, Denson SE. CSF

- neurotransmitter studies. An infant with ascorbic acid-responsive tyrosinemia. *Am. J. Dis. Child.* 1980; (134):492-494.
- Touati G, Delonlay P, Barnerias C, Beyler C, Saudubray JM. Metabolic emergencies: late acute neurologic and psychiatric presentation. *Arch Pediatr* 2003; (1):42-46.
- Tsai C, Lin P, Lee N, Niu D, Lee S, Hsu W. Corneal Lesion as the Initial Manifestation of Tyrosinemia Type II. *J Chin Med Assoc.* 2006; (69):286-288.
- Tyler, D., 1992. *The Mitochondrion in Health and Diseases*, VCH Publishers, New York.
- Uylings HB. Development of the cerebral cortex in rodents and man, *Eur. J. Morphol.* 2000; (38):309-312.
- Valikhani M, Akhyani M, Jafari AK, Barzegari M, Toosi S. Oculocutaneous tyrosinaemia or tyrosinaemia type 2: a case report. *Jeadv.* 2006; (20):591–594.
- Viglizzo GM, Occella C, Bleidl D, Rongioletti F. Richner–Hanhart Syndrome (Tyrosinemia II): Early Diagnosis of an Incomplete Presentation with Unusual Findings. *Pediatric Dermatology.* 2006. (23):259-261.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica* Artmed, Porto Alegre. 2002. 145 - 147.
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 1999; (283):1482.
- Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies e Disease mechanisms and therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2011;(30): 81-114.
- Zádori D, Klivényi P, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L. Mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation and kynurenines: Novel therapeutic strategies for

neurodegenerative disorders. Journal of the Neurological Sciences . 2012; (322):187-191.